

·基础研究·

复方地黄方对帕金森病大鼠神经行为学及氧化应激的影响*

何建成¹ 王振华¹ 袁灿兴² 庄燕鸿¹

摘要 目的:观察复方地黄方对帕金森病(PD)大鼠神经行为学及氧化应激的影响。方法:采用6-羟基多巴胺(6-OHDA)注射于脑右侧黑质造成偏侧PD模型。模型组用复方地黄方(4.14g/ml,2ml/d)中药进行治疗,此外设立了正常对照组、假手术组。观察PD大鼠神经行为学、氧化应激的变化及复方地黄方的作用。结果:PD模型组进行复方地黄方治疗后有明显的神经行为学改变,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)含量均明显降低,活性氧与丙二醛(MDA)含量升高。结论:复方地黄方能明显改善PD模型大鼠的旋转行为,提高其抗氧化能力和清除自由基的能力。

关键词 帕金森病;复方地黄方;神经行为学;氧化应激

中图分类号:R742.5 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-07-0590-03

Effects of compound rehmannia prescription on the neuroethology and oxidative stress in rats with Parkinson's disease/HE Jiancheng, WANG Zhenhua, YUAN Canxing, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(7):590—592

Abstract Objective: To observe the effects of compound rehmannia prescription on neuroethology and oxidative stress in rats with Parkinson's disease (PD). **Method:** Model of hemilateral PD rat was established with injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the substantia nigra of right side brain. The rats in PD model group were treated with compound rehmannia prescription (4.14g/ml, 2ml/d); in addition, a normal control group and a sham-operated group were established. The changes of neuroethology and oxidative stress in PD rats after treatment with compound rehmannia prescription were observed. **Result:** The rats in PD model group after treatment with compound rehmannia appeared obvious changes of neuroethology, the contents of glutathione-peroxidase (GSH-Px), glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) reduced significantly, and the contents of reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) elevated significantly. **Conclusion:** Compound rehmannia prescription can significantly improve the spinning behavior of PD model rats, and elevate its antioxidant ability and scavenging free radicals ability.

Author's address Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203

Key words Parkinson's disease; compound rehmannia prescription; neuroethology; oxidative stress

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是以震颤、肌强直、运动减少和姿势异常为特征的慢性神经系统变性疾病。近十年来中医药界对本病进行了大量研究,深化了对病因病机的认识,并发现中医药不仅可以提高临床疗效,同时可降低化学合成药物的副作用^[1]。本研究观察了复方地黄方对帕金森病大鼠神经行为学及氧化应激的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药物:复方地黄方含熟地黄、白芍、珍珠母、丹参、全蝎等,按照既定工艺煮成汤药,浓度为4.14g/ml。盐酸氯胺酮:上海中西药业股份有限公司产品,批号:050602;庆大霉素:上海第一制药厂产品,批号:061250。

1.1.2 试剂:6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA):美国Sigma公司产品;阿朴吗啡

(apomorphine, APO):美国Sigma公司产品;抗坏血酸:美国Sigma公司产品;活性氧、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.1.3 仪器:大鼠脑立体定位仪:TOW-3A型(广东);微量进样器(5μl 上海);旋涡混合器:XW-80A(上海);电热恒温水箱:HH-W21-600(上海);721型分光光度计(上海);离心机:80-2型(上海),等。

* 基金项目:国家自然科学基金(30672684);上海市教委(05CZ04);上海市重点学科(第三期)(S30302)

1 上海中医药大学基础医学院,上海,201203

2 上海中医药大学附属龙华医院

作者简介:何建成,男,博士,教授

收稿日期:2008-07-09

1.1.4 动物:SD 大鼠, 50 只, 雄性, 体重 180—220g, 由上海中医药大学实验动物中心提供。

1.2 研究方法

1.2.1 大鼠模型制备^[2]:大鼠术前按常规进行行为测试, 确认无异常旋转行为后, 用氯胺酮(80mg/kg)腹腔注射麻醉。然后将大鼠固定于脑立体定位仪上, 头部去毛, 新洁尔灭常规消毒。无菌条件下, 沿正中中线切开大鼠颅顶皮肤, 剥离骨膜, 暴露前囟。以前囟为准, 根据包新民等^[3]著大鼠脑立体定位图谱, 确定右侧黑质二坐标: ①前囟后 5.2mm, 正中右侧 1.0mm, 硬膜下 9.0mm; ②前囟后 5.2mm, 正中右侧 2.5mm, 硬膜下 8.5mm。用颅骨钻于手术要求部位小心钻开颅骨, 用 5 μ l 微量进样器将 6-OHDA(溶于含 0.02% 抗坏血酸的生理盐水中, 浓度为 2 μ g/ μ l)注入右侧黑质部(以 1.0mm/min 速度缓慢进针), 每孔 3 μ l, 注射速度为 1 μ l/min, 注射完毕后留针 5min, 然后以 1.0mm/min 速度缓慢退针。手术完成后, 用医用明胶海绵填塞颅骨孔, 缝合切口皮肤, 肌肉注射庆大霉素, 待动物清醒后放回饲养笼中饲养。

假手术组只注射含 0.02% 抗坏血酸的等量生理盐水, 其余条件与造模手术相同。正常对照组仅固定大鼠, 不进行任何处理。

10d 后, 以腹腔注射 APO 0.5mg/kg 诱发大鼠向一侧旋转, 记录开始旋转至 30min 内的旋转圈数, 以每分钟旋转圈数平均超过 7 次者为合格的 PD 模型^[4]。

1.2.2 动物分组及给药:将造模成功的 20 只实验动物, 按照随机数字表随机分为模型组、复方地黄方组, 每组 10 只; 另纳入 10 只正常大鼠为正常对照组, 10 只只注射抗坏血酸的大鼠为假手术组。

其中正常对照组、假手术组、模型组每鼠灌胃生理盐水 2ml, 复方地黄方组每鼠灌胃复方地黄方混悬液 2ml, 1 次/d, 共 14d。

1.2.3 观察指标及测试方法:实验结束后, 用 APO 再次诱导, 观察大鼠旋转行为并记录。测试完毕后, 立即断头取脑, 小心分离中脑组织, 取 6 只制备脑组织匀浆液。

1.2.3.1 脑组织匀浆液的制备:①取脑组织块 0.3—0.4g 在冰冷的生理盐水中漂洗, 除去血液, 滤纸拭干, 放入 10ml 的小烧杯内。②在烧杯中加冷的 0.86% 生理盐水 0.65ml, 并用眼科剪尽快剪碎脑组织块。③将剪碎的脑组织块悬液倒入匀浆管中, 并加入冷的 0.86% 生理盐水 0.3ml 进行充分匀浆。将匀浆液以 4000r/min 离心 15min。④将上清液置 -20℃ 冰箱中备用。

1.2.3.2 氧自由基检测方法:取适量上清液进行活性氧、MDA、GSH、GSH-Px、SOD 的检测, 具体方法按南京建成生物工程研究所试剂盒说明书步骤进行测试。

1.3 统计学分析

实验数据用均数 $\pm$ 标准差表示, 采用 SPSS10.0 版软件对数据进行齐性检验及分析, 采用单因素方差分析(ANOVA)处理实验数据。

2 结果

2.1 复方地黄方对 PD 大鼠旋转行为的影响

治疗前两组间的旋转圈数差异无显著意义($P>0.05$)。治疗后两组间的旋转圈数差异有显著意义($P<0.05$)。复方地黄方组治疗前后比较, 差异亦有显著意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 复方地黄方对 PD 大鼠旋转行为的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	治疗前	治疗后
正常对照组	10	0	0
假手术组	10	0	0
模型组	10	252.67 $\pm$ 33.91	254.78 $\pm$ 38.27 ^③
复方地黄方组	10	249.80 $\pm$ 33.62 ^①	224.22 $\pm$ 32.17 ^{②④}

①与模型组比较 $P>0.05$, ②与模型组比较 $P<0.05$, ③与治疗前比较 $P>0.05$, ④与治疗前比较 $P<0.05$

2.2 复方地黄方对 PD 大鼠氧化应激反应的影响

模型组活性氧、丙二醛明显升高, 与正常对照组、假手术组比较, 差异均有显著意义($P<0.05$, 或 $P<0.01$), GSH、GSH-Px、SOD 明显降低, 与正常对照组、假手术组比较, 差异亦均有显著意义($P<0.01$)。复方地黄组与模型组比较, 活性氧、GSH、GSH-Px、SOD、丙二醛差异均有显著意义($P<0.05$)。见表 2。

3 讨论

中医学认为帕金森病是一个多种原因、多种机制参与的难治性疾病, 常因年老体弱, 或劳欲过度, 致肝肾阴虚, 水不涵木, 风阳上扰、内风暗动; 或由居处不利、外感毒邪等因素, 伤及肝、肾、脑髓, 则脑髓受损, 脑窍失用所致。其病理性质总属本虚标实, 本虚为肝肾亏损, 脏腑功能失调; 标实为风、痰、瘀互结, 蕴塞脑窍。是故其治宜多法复方, 诸法共用, 综合调治, 方为上乘之治法, 任何仅用一法的治疗将失于偏颇。故认为滋补肝肾、平肝熄风、活血化痰、蠲痰散结三法综合运用应该是其治疗法则^[5]。复方地黄方便是以此为依据组方而成的中药复方。

6-OHDA 可以选择性损毁脑部注射区内的多巴胺能神经元, 使注射同侧的多巴胺能神经元末梢溃变, 多巴胺(dopamine, DA)含量下降, DA 受体超敏。当黑质纹状体 DA 能神经元损伤超过 50%, 纹状体

表 2 复方地黄方对 PD 大鼠氧化应激反应的影响

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	活性氧(U/mg)	GSH(mg/g)	GSH-Px(NU/g)	SOD(NU/mg)	丙二醛(nmol/mg)
正常对照组	6	81.33±5.58 ^①	7.01±1.28 ^②	3.87±0.41 ^②	180.17±8.47 ^②	4.24±2.31 ^②
假手术组	6	80.97±8.92 ^①	7.02±1.25 ^②	3.79±0.35 ^②	185.73±8.31 ^②	4.41±2.27 ^②
模型组	6	112.73±8.08	4.15±0.68	3.06±0.51	131.34±4.73	11.35±2.05
复方地黄组	6	87.75±11.08 ^①	6.04±1.57 ^①	3.27±0.25 ^①	173.32±7.24 ^①	5.47±2.12 ^①

与模型组比较: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$

DA 含量下降 80%以上时, DA D₂ 受体就会代偿性大量增加, 且敏感性增高。此时当注射 APO 后, 便与该侧纹状体内大量增加的 DA D₂ 受体结合, 并使受体出现超敏现象, 引起动物向健侧旋转。APO 诱导后大鼠的旋转圈数与脑黑质纹状体系统的损毁程度呈正相关^[6], 由于迄今尚无有效的非侵袭性生理学方法检测该模型 DA 能神经系统的损伤程度, 因此, 检测造模大鼠的旋转行为已成为衡量单侧 6-OHDA 损伤后果的最常用手段^[7]。

本研究显示, 对应用 6-OHDA 损毁黑质所造成的 PD 模型在 14d 后进行行为学检测, 发现其旋转行为与第 1 次检测结果相近, 差异无显著意义, 提示该模型稳定、可靠。本研究结果还表明, 复方地黄方组与模型组间的旋转圈数差异有显著意义 ($P<0.05$)。提示复方地黄方能够改善 PD 大鼠药物诱发的旋转行为异常。

已有的研究证实, PD 患者脑内抗氧化和自由基清除系统功能低下, 黑质中 GSH、过氧化氢酶(CAT)和 GSH-Px 含量均有不同程度减少, 加剧了自由基损害^[8]。目前多数学者认为氧化应激是黑质 DA 能神经元选择性损伤的关键因素^[9-10]。

在生物体内, 脑组织更易受氧化反应及其产生的自由基的损害, 这是因为: ①它含有大量的、高浓度的不饱和脂肪酸 (其是脂质过氧化反应的底物); ②大脑需要相对多的 O₂ 供应; ③脑内自由基清除功能相对缺乏, 例如它几乎不含 CAT, 与肝脏相比, 它的 GSH、GSH-Px 及 VitE 含量明显为少; ④有些脑区内铁的含量较高。以上几点在黑质中表现得最为突出^[11-12]。

在帕金森病发病过程中, 氧化应激不仅与高 ROS 过度产生有关, 也与机体清除 ROS 和抗氧化能力降低有关。GSH 为一种低分子自由基清除剂, 可清除 H₂O₂、O₂⁻, GSH 系统是脑组织内最重要的抗氧化系统^[13], GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的催化 H₂O₂ 分解的酶, 可特异催化 GSH 对 H₂O₂ 的还原反应, 对细胞结构和功能的完整具有重要的保护作用; SOD 能清除 O₂⁻, 其活力的高低间接反应了机体清除自由基的能力; MDA 的高低又间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度。

本结果表明, 模型组 GSH、GSH-Px、SOD 的含

量均明显降低, 活性氧、丙二醛(MDA)的含量升高, 提示 PD 大鼠的氧化反应被激活, 处于氧化应激状态, 符合 PD 氧化应激的发病机制。而经复方地黄方治疗后, GSH、GSH-Px、SOD 的含量均有不同程度的升高, 活性氧、MDA 的含量下降, 提示复方地黄方可以提高机体的抗氧化能力和清除自由基的能力。

现代中药药理研究表明, 白芍总苷、丹参等均对自由基有较强的清除能力, 认为复方地黄方可能是通过局部治疗与整体调节作用, 达到了对自由基的清除作用, 从而使机体免受自由基的损害。

参考文献

- [1] He Jiancheng, Wei Hongchang, Yuan Canxing. present situation and prospects of TCM treatment of Parkinson's disease [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2004, 24(4): 308—314.
- [2] Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of Central monoamine neurons [J]. Eur J Pharmacol, 1968, 5(1): 107—110.
- [3] 包新民, 舒思云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 53.
- [4] Sanchez-Iglesias S, Rey P, Mendez-Alvarez E, et al. Time-course of brain oxidative damage caused by intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine in a rat model of Parkinson's disease [J]. Neurochem Res, 2007, 32(11): 99—105.
- [5] 何建成. 帕金森病中医药治疗的再思考——兼谈“滋肾平肝, 活血化瘀, 蠲痰散结”是帕金森病的基本治法 [J]. 中医药通报, 2005, 4(1): 12.
- [6] Henderson JM, Watson S, Halliday GM, et al. Relationships between various behavioural abnormalities and nigrostriatal dopamine depletion in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat [J]. Behav Brain Res, 2003, 139(1-2): 105—113.
- [7] 何建成, 袁灿兴, 卫洪昌. 6-羟基多巴胺制备帕金森病大鼠模型的神经行为学特点 [J]. 中国临床康复杂志, 2005, 9(29): 68—69.
- [8] Storch A, Hwang YI, Gearhart DA, et al. Dopamine transporter-mediated cytotoxicity of beta-carbolinium derivatives related to Parkinson's disease: relationship to transporter-dependent uptake [J]. J Neurochem, 2004, 89(3): 685—694.
- [9] 袁红, 梁立武, 刘平, 等. 氧化应激与帕金森病多巴胺神经元死亡 [J]. 武警医学, 2007, 18(6): 448—450.
- [10] Holtz WA, Turetzky JM, Jong YJ, et al. Oxidative stress-triggered unfolded protein response is upstream of intrinsic cell death evoked by Parkinsonian mimetics [J]. J Neurochem, 2006, 99(1): 54—69.
- [11] Dexter DT, Sian J, Rose S, et al. Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental lewy body disease [J]. Ann Neurol, 1994, 35(1): 38—44.
- [12] Peng J, Stevenson FF, Doctrow SR, et al. Superoxide dismutase/catalase mimetics are neuroprotective against selective paraquat-mediated dopaminergic neuron death in the substantia nigra: implications for Parkinson disease [J]. J Biol Chem, 2005, 280(32): 29194—198.
- [13] 金雪红, 包仕尧. 还原型谷胱甘肽合用粉防己碱对帕金森病大鼠抗氧化效应的研究 [J]. 中国临床神经科学, 2007, 15(2): 139—142.